

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

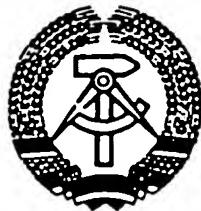
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

09/003,047 A
PATENTSCHRIFT 3

(19) DD (11) 275 704 A1

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 320 082 0

(22) 23.09.88

(44) 31.01.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Boriss, Rainer, Dr. sc. nat.; Wobus, Ulrich, Prof. Dr. sc. nat.; Mendel, Ralf-Rainer, Dr. rer. nat.; Bäumlein, Helmut, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Gerstenpflanzen

(55) Glukanase, Brauindustrie, Viskosität der Braumaische, Braugerste, Expressionskassette, Gerstenpflanzen, rekombinantes Plasmid

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, das eine beta-Glukanase herzustellen erlaubt, die in der Brauindustrie zur Verarbeitung großer Rohfruchtmengen eingesetzt werden kann, um die Viskosität der Braumaisch erhöhende Glukan-Verbindungen hydrolytisch zu spalten; dafür soll nach Möglichkeit kein oder nur in geringer Meng ein Glukanasepräparat verwendet werden, sondern die Braugerste mit einem Glukanase-Gen bereits in der Pflanze versehen sein. Zu diesem Zweck wird ein Gen für die beta-Glukanase in einer Expressionskassette angeordnet, die auf einem Vektorplasmid konstruiert wird, das in Gerstenpflanzen transformiert werden muß. Die transformierten Pflanzen werden selektiert und regeneriert und liefern im Maischprozeß die erforderliche beta-Glukanase.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Gerstenpflanzen, insbesondere für die Verwendung in der Brauindustrie, die mit dem Gen für eine thermostabile endo-beta-1,3-1,4-Glukanase ausgestattet sind dadurch gekennzeichnet, daß eine Expressionskassette einschließlich des Gens für die thermostabile endo-beta-1,3-1,4-Glukanase auf einem Vektorplasmid konstruiert wird, das sich in *Escherichia coli* vermehren läßt, daß die DNS dieses nunmehr rekombinanten Plasmids in Zellen von Gerstenpflanzen transformiert wird und nach Selektion von tatsächlich transformierten Zellen vollständige Gerstenpflanzen regeneriert werden, wobei die Expressionskassette aus

- einer pflanzlichen Promotor-Region,
- einer Transkriptions-Initiations-Region mit nachfolgender, für das Gen für endo-beta-1,3-1,4-Glukanase kodierenden Region einschließlich einem Stop-Signal für die Translation, und
- einer 3'-flankierenden Region für korrektes processing und Polyadenylierung und damit die Expression der mRNS der endo-beta-1,3-1,4-Glukanase

besteht.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Gerstenpflanzen, insbesondere für die Verwendung in der Brauindustrie, die mit dem Gen für eine thermostabile endo-beta-1,3-1,4-Glukanase ausgestattet sind.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für die Herstellung verschiedener Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel werden Glukanase-Präparate eingesetzt, wenn die hydrolytische Spaltung der beta-glykosidischen Bindungen von beta-1,3-1,4-Glukanen beabsichtigt ist; vor allem in der Brauindustrie wird durch den Einsatz solcher pflanzenglukan-hydrolyzierender Enzyme die Verarbeitung größerer Rohfruchtmengen, zum Beispiel von Gerste anstelle von Malz, möglich, ohne daß dabei Schwierigkeiten bei der Filtration und Läuterung der Braumaische infolge ungenügend abgebauter, viskositätsverhöhender Glukan-Verbindungen zu befürchten wären.

Es ist seit langem bekannt, die Viskosität der Braumaische mit Hilfe von beta-Glukanasen mesophiler *Bacillus*-Stämme, wie von *Bacillus amyloliquefaciens* oder von *Bacillus subtilis*, herabzusetzen^{1/}. Auch die Verwendung gentechnisch manipulierter *Bacillus*-Stämme, die das beta-Glukanase-Gen von *Bacillus amyloliquefaciens* in amplifizierter Form auf einem Vektorplasmid enthalten, ist zur Verbesserung der Ausbeute von mesophiler Glukanase entsprechend einem älteren Vorschlag der gleichen Anmelderin bereits ins Auge gefaßt^{2/}.

Der Nachteil dieser vorbekannten Verfahren besteht darin, daß ein spezielles Enzym der Braumaische zugesetzt werden muß lediglich, um deren Viskosität abzusenken, ohne daß ein solches Präparat sonst gebraucht würde, und daß nach Aufbereitung der Braumaische das zugesetzte Enzym inaktiviert ist.

Es ist auch schon bekannt, das Gen für endo-beta-1,3-1,4-Glukanase von *Bacillus subtilis* in verschiedenen Hefestämmen zur Expression zu bringen^{3/}; ^{4/}; ^{5/}; ^{6/}. Dabei wird dieses Gen in ein in *Saccharomyces cerevisiae* autonom replizierendes Plasmid eingebaut und als Selektionsmarker die Resistenz gegenüber Kupfer genutzt. Leider sind bei diesen Konstruktionen die entstehenden Transformanten mitotisch instabil, das heißt, nach mehreren Passagen auf nichtselektivem Medium gehen die Plasmide und damit das Glukanase-Gen verloren.

Ferner ist es gelungen, eine Brauereihefe – *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis* – zu konstruieren, bei der das Gen für endo-beta-1,3-1,4-Glukanase des Pilzes *Trichoderma reesei* in das Genom einer Hefe integriert worden ist^{7/}. Dabei wird aber dieses Gen durch Austausch mit dem Gen für Phosphoglyzeratkinaise in das Chromosom der Hefe eingebaut. Da diese Kinase ein Enzym der Glykolyse ist und das zugehörige Gen beim Einbau des Gens für die Glukanase in mindestens einer Kopie verloren geht, kommt es bei diesen Brauereihufen, die in der Regel polyploid sind, zur Verringerung der Aktivität der Phosphoglyzeratkinaise und damit zu verminderter Wachstumsgeschwindigkeit.

Inzwischen wurden diese Schwierigkeiten durch einen Vorschlag der Anmelderin^{8/} teilweise beseitigt. Trotzdem ist es generell unpraktisch, daß mikrobielle Enzyme für den Brauvorgang speziell entweder direkt zugeführt werden müssen, was von manchen Herstellern als nicht natürlich strikt abgelehnt wird, oder die Brauhefe entsprechend manipuliert werden muß, wobei auf den ferneren Zusatz von Enzymen nicht vollständig verzichtet werden kann; in jedem Fall sind diese Verfahren durchweg kostspielig und erfordern ständige technologische Betreuung.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, die Wirtschaftlichkeit des Brauprozesses hinsichtlich der Verwendung von endo-beta-1,3-1,4-Glukanase zu verbessern und den weitergehenden Einsatz von Gersten-Rohfrucht anstelle von Malz zu ermöglichen, ohne die oben ausführlich beschriebenen Schwierigkeiten in Kauf nehmen zu müssen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Demzufolge hat sich die Erfindung die Aufgabe gestellt, Gerstenpflanzen genetisch so zu verändern, daß sie im Brauprozess selbst genügend endo-beta-1,3-1,4-Glukanase bereitstellen, ohne daß spezielle Zusätze direkt oder über die Brauhefe benötigt werden, und daß diese Glukanase bereits gebildet wird, wenn die Gerstensamen reifen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß eine Expressionskassette einschließlich des Gens für die thermostabile endo-beta-1,3-1,4-Glukanase auf einem Vektorplasmid konstruiert wird, das sich vorzugsweise in *Escherichia coli* vermehren läßt, daß die DNS dieses nunmehr rekombinanten Plasmids in Zellen von Gerstenpflanzen transformiert wird und nach Selektion von tatsächlich transformierten Zellen vollständige Gerstenpflanzen regeneriert werden, wobei die Expressionskassette aus einer pflanzlichen Promotor-Region, einer Transkriptions-Initiations-Region mit nachfolgender, für das Gen für endo-beta-1,3-1,4-Glukanase kodierenden Region einschließlich einem Stop-Signal für die Translation, und einer 3'-flankierenden Region für korrektes processing und Polyadenylierung und damit die Expression der mRNS der endo-beta-1,3-1,4-Glukanase besteht. Auf diese Weise werden die Nachteile des Standes der Technik in überraschend einfacher Weise beseitigt. Durch die Erfindung läßt sich nun die Bildung der thermostabilen endo-beta-1,3-1,4-Glukanase beliebig steuern. So kann man ohne Schwierigkeit erreichen, daß das Genprodukt bereits im nichtgekeimten Gerstenkorn akkumuliert wird, so daß der Anteil unvermalzter Gerstenrohfrucht beim Maischvorgang ohne weiteres erhöht werden kann. Bemerkenswerterweise gestattet es die Erfindung, auf mikrobielles Enzym zu verzichten und damit den Brauvorgang zu verbilligen, ohne daß in den sonstigen technologischen Prozeß eingegriffen werden müßte.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Dazu wird in Tabelle 1 die Nukleotid-Sequenz eines DNS-Fragmentes mit dem Gen für die endo-beta-1,3-1,4-Glukanase von *Bacillus macerans* angegeben.

Das Gen für die endo-beta-1,3-1,4-Glukanase – nachfolgend kurz Glukanase-Gen genannt – wird in bekannter Weise/9/ aus *Bacillus macerans* gewonnen und kloniert. Ausgehend von einem DNS-Fragment von 850 Basenpaaren, das die gesamte kodierende Region für das Glukanase-Gen einschließlich der kompletten Promoter-Region trägt/9/, werden mittels des Restriktionsenzymes *Dra*I die ersten 70 Nukleotide am 5'-Ende des DNS-Fragmentes entfernt. Diese Schnittstelle befindet sich 23 Nukleotide vor dem ATG-Startkodon und führt zu einer partiellen Entfernung des Promotors stromaufwärts der -10-Region. Die bakterielle Ribosomen-Bindungsstelle bleibt erhalten. In der Tabelle ist die komplette Nukleotid-Sequenz des DNS-Fragmentes gezeigt. Nach Klonierung des verkürzten, nun aus nur noch 780 Basenpaaren bestehenden DNS-Fragmentes in einen Vektor pUC 19/9/ an den Schnittstellen *Hind*III und *Dra*I/*Hinc*II wird das partiell promotorlose, verkürzte DNS-Fragment in folgender Weise innerhalb der „multi cloning site“ des Vektors pUC 19 eingebaut: 5'-Ende – *Hind*III/*Sph*I/*Pst*I – DNS Fragment – *Xba*I/*Bam*HI/*Sma*I/*Kpn*I/*Sac*I/*Eco*RI – 3'-Ende. Damit hat man einen Modul für den Aufbau einer Expressionskassette gewonnen.

Zur Steuerung der Expression des Gens während der Samenreife werden Promotoren aus der Ackerbohne/10/ verwendet, die nachweislich auch in anderen Pflanzen nachgeschaltete Gene exprimieren/10/. Das Plasmid p delta 4/12/10/ enthält den Promotor des Samenprotein-Gens Legumin B4/11/; durch dessen Spaltung an seiner (unikalen) *Bam*H1-Schittstelle wird das Glukanase-Gen eingefügt; dabei ist seine richtige Orientierung zu sichern. Daran anschließend wird eine pflanzliche 3'-flankierende Region eingeschleust; ein *Sau*3A-Fragment des Samenprotein-Gens Legumin B4 enthält die notwendigen Sequenz-Stücke.

Die 3'-flankierende Region kann auch leicht aus einem vorbekannten Plasmid pOcs 2/12/ mittels einer *Bam*HI-*Hind*III-Doppelspaltung gewonnen werden.

Eine so hergestellte Expressionskassette gestattet es, das zugehörige Vektorplasmid unmittelbar zur direkten Transformation von Zellen von Gerstenpflanzen einzusetzen.

Es ist auch möglich, einen samenspezifischen Promotor P30.1 zu verwenden, der auf einem Plasmid pUC/USPP vorliegt/10/. Nach einer Linearisierung mittels des Restriktionsenzymes *Bgl*II kann wie oben beschrieben verfahren werden, und man erhält auch auf diesem Wege ein für die direkte Transformation geeignetes Vektorplasmid.

In beiden Fällen können darüber hinaus Promotor-Gen-Fragmente gewonnen werden, die zusätzlich zum Promotor und zur für die 5'-Region der mRNS kodierenden Sequenz Teile der Samenprotein-Kodierungs-Sequenz enthalten, um die korrekte Kanalisierung und Speicherung der endo-beta-1,3-1,4-Glukanase im Gersten-Endosperm zu sichern.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Steuerelemente, also die Promotoren zusammen mit den 3'-Regionen, aus den Samenprotein-Genen der Gerste selbst oder anderer Getreide zu verwenden; beispielsweise ein *Hind*III-*Bst*X1-Fragment des Gersten-Hordein-Gens B1 als Promotor und ein *Xba*I-*Hind*III-Fragment als 3'-Region/13/. Diese Fragmente werden zusammen mit dem aus 780 Basenpaaren bestehenden DNS-Fragment mit dem Glukanase-Gen in fachüblicher Weise in das bereits genannte Plasmid pUC 18 eingebaut und direkt transformiert, gegebenenfalls zusammen mit einem Selektionsmarker. Auch ein Hafer-Samenprotein-Promotor als *Bam*H1-*Hind*III-Fragment aus einem Plasmid pPg 108/14/ ist für diesen Zweck geeignet. Schließlich kann die Expressionskassette, ohne die Erfindung zu verlassen, auch in einem Ti-Plasmid-Vektor transformiert werden. In unmittelbarer Nachbarschaft der Expressionskassette befindet sich wie bereits erwähnt ein in den Gerstenpflanzen selektierbares Marker-Gen, beispielsweise das die Kanamycin-Resistenz vermittelnde npt-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors wie etwa CaMV35S.

Die Transformation wird wie folgt durchgeführt.

Aus einer Suspensions-Zellkultur von Gerste werden Protoplasten in bekannter Weise/15/ isoliert und in einem Medium resuspendiert, welches 0,6 Mol Mannit sowie $60 \cdot 10^{-3}$ Mol *CaCl*2 und 10^{-3} Mol MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5,6 enthält. Die Protoplasten werden einer Hitzebehandlung von 45°C über 5 min unterzogen und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu 10^6 Protoplasten in einem Volumen von $0,25 \cdot 10^{-3}$ l werden $15 \cdot 10^{-6}$ g Vektor-DNS in zirkulärer Form in einem Volumen von $15 \cdot 10^{-6}$ l zugesetzt sowie daran anschließend $0,1 \cdot 10^{-3}$ l Polyethylenglykol 6000 (24°C in 0,6 Mol Mannit und 10^{-3} Mol MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5,6). Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wird in $2 \cdot 10^{-3}$ l KAO-Medium/16/ eingebettet.

das nur 1/5 der Konzentration an Makro- und Mikrosalzen enthält und als Osmotikum Mannit (Gesamtmolarität = 0,7 osmol), als Hormone 10^{-3} g/l Zeatin und 10^{-3} g/l 2,4-D sowie niedrigschmelzende Agarose (Endkonzentration = 0,6%) von BRL/17/ und als selektives Agens $10\ldots20\cdot10^{-3}$ g/l G 418.

Heranwachsende Kolonien werden auf Aktivität der vom npt-Marker-Gen kodierten Neomycin-Phospho-Transferase und auf korrekte Integration der Expressionskassette, (Southern-Hybridisierung) getestet. Auf diese Weise selektierte Calli werden zu Gerstenpflanzen regeneriert und auf Expression des Glukanase-Gens während der Samenreife kontrolliert.

Literatur

- /1/ Boriss, R. u. Schroeder, K.-L., Zbl. Bakt. II. Abt., 136 (1981), S. 324-329
- /2/ DD-Patentschrift 226 012
- /3/ GB-Patentschrift 2175 590
- /4/ EP-Patentschrift 147 198
- /5/ Cantwell, B.A. et al., Curr. Genet. 11 (1986), S. 65-70
- /6/ Hinchliffe, E./Box, W.G., Curr. Genet. 8 (1984), S. 471-475
- /7/ Penttilae, M. E. et al., Curr. Genet. 12 (1987), S. 413-420
- /8/ DD-Patentanmeldung WP C 12 N/317 5184
- /9/ DD-Patentanmeldung WP C 12 N/315 7061
- /10/ DD-Patentanmeldung WP C 12 N/305 1366
- /11/ DD-Patentschrift 240 911
- /12/ Montagu, M. v. et al., Lab. Genet./Univ. Gent, unveröffentl.
- /13/ Brandt, A. et al., Carlsberg Res. Comm. 50 (1985), S. 333-345
- /14/ Schubert, R. et al., Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der AdW der DDR, unveröffentl.
- /15/ Luehrs, R./Loerz, H., Planta (im Druck)
- /16/ Kao, K.M./Michayluk, M. R., Planta 115 (1974), S. 355-367
- /17/ Hersteller: Gribzo/BRL GmbH (BW)

29.8.88 TRANSLATION VON BGLMAC.NSO

DNA SEQUENCE TRANSLATION PROGRAM

21GuK Gatersleben 70 . TAAATCATTTGGAGGTATTATGAAAAGAAGTCCTGTTTACACTGGTGAACACATTGGAGTACATGGAAAAGGCAAGATGGGTTCTGTAAGC
160 . 170 . 180 . 190 . 200 . 210 . 220 . 230 . 240 .
AlaLeuAlaGlySerValPhoTyrGluProLeuSerTyrPheAsnProSerThrTyrGluLeuAspGlyTyrSerAsnGlyGlyVal
250 . 260 . 270 . 280 . 290 . 300 . 310 . 320 . 330 .
TTCAATTGGCACATGGCGTGCACAACTTACGAATGATGAAAAGCTCAAGCTGGCTTAACGAGTTCTGCGTACAACAAATT
340 . 350 . 360 . 370 . 380 . 390 . 400 . 410 . 420 .
PheAsnCysThrTyrAlaAsnValAsnValPhoTyrAsnAspGlyLysLeuLysLeuGlyLeuThrSerSerAlaTyrAsnLysPho
GAATGGGAGTACCGATCAACGAACATTACGGATACTGGCTCTGTACGAGGTCACTGATGAAAGCAGCCAAAATAACAGGAATTGTC
430 . 440 . 450 . 460 . 470 . 480 . 490 . 500 . 510 .
AspCysAlaGluTyrArgSerThrAsnLeuTyrGlyLeuTyrGlyLeuTyrGlyLeuTyrGluValSerMetLysProAlaLysAsnThrGlyLeuValSer
TCCTTTTCACGTTACAGGACCTGCTCATGGCACACAAATGGGATGAAAATAGATACTCGAAATTCTAGAAAAGAACACGCCAAAAGTC
520 . 530 . 540 . 550 . 560 . 570 . 580 . 590 . 600 .
SerPhePheThrTyrTyrGlyProAlaHisGlyThrGlnTriPaspGlyLysLeuAspLeuAspLysGluPheLeuGlyLysAspThrThrValGln
TTAACTATTACCAATGGGTTGGGGTCACTGAAAAGGTTATCTCTGGCTTTGATGCATCAAAGGGCTTCCATACCTATGCTTT
610 . 620 . 630 . 640 . 650 . 660 . 670 . 680 . 690 .
PheAsnTyrTyrThrAsnGlyValGlyGlyHisGluLysValleSerLeuGlyPheAspAlaSerLysGlyPhoHisThrTyrAlaPho
GATTGGCAGCCAGGGTATATTAAATGGTATGTAGACGGTGTGTTGAAACATACCGCCACCGGAATATTCCGAGTACGCCAGGCCAAATT
700 . 710 . 720 . 730 . 740 . 750 . 760 . 770 . 780 .
AspTriPaspGlyTyrValAspGlyValAspGlyTyrValAspAspAspTyrLeuGlySerTyrAsnGlyAlaAsnProLeuTyrAspTriVal
ATGATGAATCTATGGAACCGGAACGGGAGTGGATGACTGGTTAGGTTCTTATAATGGAGCGGAATCCGTTGACGCTGAATATGACTGGTA
790 . 800 . 810 . 820 . 830 . 840 . 850 .
MetMetAsnLeuTriPaspAsnGlyTyrGlyValAspAspAspTyrLeuGlySerTyrAsnGlyAlaAsnProLeuTyrAspTriVal
AAATAACGAGCAAATTAAATGATTGCACTGGCATGAGCTTTTTAGTCCCACTCCAGGCATGC
LysTyrThrSerAsn....

Seite 1
VERSION 4.1 - J.PUSTELL 1982
Version 4.3 - H.-W.Jank 1987
Base 70 bis Base 852 gedruckt Sequenz ab Base 1 numeriert.
238 Codons insgesamt 4 Start(ATG)-Codon(s), 1 Stop-Codon(s), 0 unidentifiziert(s) Codon(s)

b 350:351

Menu system 5.35E ends.

```
01feb93 16:37:12 User218304 Session A249.2
Sub account: 24615/2003300/6094
$0.50 0.033 Hrs FileHomeBase
$0.50 Estimated cost FileHomeBase
$0.20 DIALNETL
$0.70 Estimated cost this search
$0.70 Estimated total session cost 0.033 Hrs.
```

SYSTEM:OS - DIALOG OneSearch

File 350:Derwent World Patents Index

1963-1980, EQUIVALENTS THRU DW=9247

**FILE350: Format 9 includes the expanded patent table.

Preformatted

REPORTs are available. Type ?FMT350, ?NEWS350, ?RATES350 for more info.

File 351:DERWENT WORLD PATENTS INDEX-LATEST

1981+;DW=9250,UA=9237,UM=9208

**FILE351: Format 9 includes the expanded patent table.

Preformatted

REPORTs are available. Type ?FMT351, ?NEWS351, ?RATES351 for more info.

Set	Items	Description
---	----	-----
?s pn=dd 275704	S1	1 PN=DD 275704
?t s1/9/all		

1/9/1 (Item 1 from file: 351)
008323630 WPI Acc No: 90-210631/28

XRAM Acc No: C90-091021

Prepn. of barley plants expressing heat stable beta-glucanase
- by
transforming cells with appropriate vector then regeneration
giving

seeds useful in brewing without conversion to malt
Index Terms: PREPARATION BARLEY PLANT EXPRESS HEAT STABILISED
BETA

GLUCANASE; TRANSFORM CELL APPROPRIATE VECTOR REGENERATE SEED
USEFUL

BREW CONVERT MALT

Patent Assignee: (DEAK) AKAD WISSENSCHAFT DDR

Author (Inventor): BORRISS R; WOBUS U; MENDEL R R; BAUMLEIN H

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
DD 275704	A	900131	9028 (Basic)

Priority Data (CC No Date): DD 320082 (880923)

Abstract (Basic): DD 275704

Prodn. of barley plants provided with the gene (I) for a

heat-stable endobeta-1,3-1,4-glucanase (A) comprises (1) constructing an expression cassette including (I) in a vector plasmid, (2) replicating this in E.coli, (3) transforming the plasmid DNA into barley cells (4) selecting transformed cells and (5) regenerating these into complete barley plants.

The cassette consists of (1) a plant promoter region, (2) a transcription initiation region, followed by a region contg. (I) plus a translation stop signal and (3) a 3'-flanking region for correct processing and polyadenylation, ensuring expression of the mRNA for (A).

USE/ADVANTAGE - These plants are esp. useful in brewing, (A) accumulates in the ripe (but ungerminated) seeds, so the proportion of such seeds, relative to malted seeds, used in the mashing process can be increased, without causing an unacceptable increasing in viscosity.

Addn. of an exogenous (A) is not required. @ (5pp Dwg. No. 0/1) @

File Segment: CPI

Derwent Class: D16;

Int Pat Class: C12N-015/00

Manual Codes (CPI/A-N): D05-B01

?logoff^Hff

01feb93 16:38:02 User218304 Session A249.3
Sub account: 24615/2003300/6094
\$0.40 0.002 Hrs File350
\$0.40 Estimated cost File350
\$2.77 0.014 Hrs File351
\$1.80 1 Type(s) in Format 9
\$1.80 1 Types
\$4.57 Estimated cost File351
OneSearch, 2 files, 0.016 Hrs FileOS
\$0.10 DIALNETL
\$5.07 Estimated cost this search
\$5.77 Estimated total session cost 0.050 Hrs.

Logoff: level 29.01.09 A 16:38:02

DIALNET: call cleared by request

Enter Service: